

12

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: 88402259.1

51 Int. Cl.4: C 12 P 13/04
C 12 N 9/86
// C12N9/90

22 Date de dépôt: 08.09.88

30 Priorité: 21.09.87 FR 8713030

43 Date de publication de la demande:
29.03.89 Bulletin 89/13

64 Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Demandeur: SOCIETE FRANCAISE HOECHST Société
anonyme dite:
3, avenue du Général de Gaulle
F-92800 Puteaux (FR)

72 Inventeur: Ohleyer, Eric
Hery sur Alby
F-74430 Alby sur Cheran (FR)

74 Mandataire: Rinuy, Santarelli
14, avenue de la Grande Armée
F-75017 Paris (FR)

54 Nouveau système enzymatique, son procédé de préparation et son application notamment dans la préparation de la D-parahydroxyphénylglycine.

57 Système enzymatique susceptible d'être obtenu par culture d'un micro-organisme caractérisé par le fait que ce micro-organisme est un Agrobacterium très proche de l'espèce tumefaciens identifié par une souche déposée à la Collection Nationale des Micro-organismes à l'Institut Pasteur de Paris sous le N° I-671.

Application à la transformation de la D,L-parahydroxyphényl-5 hydantoïne en D-parahydroxyphénylglycine.

EP 0 309 310 A1

Description

Nouveau système enzymatique, on procédé de préparation et son application notamment dans la préparation d la D-parahydroxyphénylglycine.

La présente invention concerne un nouveau système enzymatique, son procédé de préparation et son application à la préparation par voie enzymatique de la D-parahydroxyphénylglycine.

Aujourd'hui, on utilise de plus en plus des procédés enzymatiques pour accéder à des substances présentant une configuration déterminée sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des séparations fastidieuses d'énantiomères ou de diastéréoisomères. Tel est le cas de la D-parahydroxyphénylglycine, désignée ci-après PHPG, qui est un amino-acide couramment utilisé dans l'élaboration d'agents antibactériens.

Pour l'obtenir, on a recours, très souvent, à la D,L-parahydroxyphényl-5 hydantoïne, désignée ci-après PHPH.

Le système enzymatique objet de la présente invention permet de transformer par voie enzymatique de la PHPH en PHPG.

On sait que la parahydroxyphényl-5 hydantoïne racémique peut être hydrolysée par voie enzymatique, en acide D-alpha uréidoparahydroxyphénylacétique, hydrolysable ensuite, par voie chimique, en PHPG (cf. notamment les brevets français 2.310.986, 2.317.357, 2.383.961, la demande de brevet allemand N° 27 57 980 et les demandes de brevet japonais N78-44690, 80-104890, 81-23892 et 86-177991).

On sait par ailleurs que certains systèmes enzymatiques n'hydrolysent que l'isomère D de la parahydroxyphényl-5 hydantoïne en PHPG (cf. brevet français 2.393.848 et demande de brevet japonais 86-177991).

Enfin, il est connu que certains autres systèmes enzymatiques issus de micro-organismes du type Hansenula, Pseudomonas Arthrobacter, Alcaligenes, Achromobacter Moraxella, Flavobacterium, Agrobacterium sont susceptibles de transformer la PHPH en PHPG (cf. notamment brevet français 2.438.087, 2.456.728, demande de brevet européen 0.199.943 et demandes de brevet japonais 79-89088, 80-114291, 80-114292 et 86-181391).

Toutefois, ces systèmes enzymatiques permettant de transformer directement la PHPH en PHPG fournissent généralement de la PHPG soit avec un faible rendement, soit avec une faible productivité. De plus, ces systèmes enzymatiques travaillent en fait à un pH supérieur à 7, ce qui entraîne des colorations parasites altérant la PHPG obtenue et nécessitant des purifications ultérieures contraignantes qui affectent grandement l'emploi de la PHPG obtenue par ces systèmes dans la synthèse d'antibiotiques semi-synthétiques dont c'est l'une de ses applications essentielles.

Or la Demanderesse a découvert avec étonnement un nouveau système enzymatique remédiant à ces inconvénients et permettant d'obtenir directement avec des rendements et une productivité satisfaisants une PHPG pure et incolore.

Le système enzymatique selon la présente invention est obtenu par culture d'un micro-organisme,

identifié plus complètement ci-après, dans un milieu convenable.

Le micro-organisme dont la culture dans des conditions appropriées fournit le système enzymatique selon l'invention, doit être considéré comme une espèce qui appartient au genre Agrobacterium.

Il a été isolé à partir d'un échantillon de boue prélevée à Stains (France) selon les méthodes habituelles d'isolement des micro-organismes. Un échantillon de cette souche a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, Institut Pasteur, 75724 Paris Cédex 15, où il a été enregistré sous le numéro I-671, le 29 juin 1987.

Ce micro-organisme, dénommé Agrobacterium sp EO III 50, désigné par la suite EO III 50 P, est un Agrobacterium très proche de l'espèce tumefaciens. A la connaissance de la Demanderesse, cette souche n'est pas décrite dans la littérature.

Les caractères culturels et morphologiques de ce micro-organisme sont les suivants :

Eléments de base

- bacilles de diamètre moyen, de forme homogène, sans arrangement notable,

- mobilité ++ (1-3 flagelles d'implantation peritriche de 2 à 4 longueurs d'onde - imprégnation aux sels d'aluminium),

- coloration de Gram -,

- lyse par le KOH 3% + + +,

- aminopeptidase (CZERNY) + + +,

- culture apparente en gélose profonde : aérobie obligatoire,

- culture luxuriante sur géloses ordinaires : colonies opalescentes, étendues, d'un diamètre de 3-5 mm, aux contours et à surfaces lisses, légèrement confluentes entre elles (gélose Columbia, 30°, atmosphère ambiante, 4 jours d'incubation),

- culture en bouillon : NaCl 0% + + +,

- culture en bouillon : NaCl 2% + + +,

- culture en bouillon : NaCl 4% + + +,

- culture en bouillon : NaCl 6% -,

- culture en bouillon : NaCl 8% -,

- culture en bouillon : NaCl 10% -

(milieu de base bouillon PYG),

- culture à 10° + +,

- culture à 30° + + +,

- culture à 41° -,

(milieu de base gélose Columbia),

- culture prototrophe,

- pigment -,

- catalase +,

- réaction d'oxydase + + +,

- production acide en aérobiose à partir du glucose +,

- production acide en anaérobiose à partir du glucose -,

- nitrate réductase + + +,

- nitrite réductase + + +,

- production de gaz à partir des nitrates -,

- production de gaz à partir des nitrites -,

- culture en anaérobiose en présence de nitrates +.

- thiosulfate réductase -,
- tétrathionate réductase -,
- uréase + + +,
- phénylalanine désaminase -,
- "arginine dihydrolase" -,
- "lysine décarboxylase" -,
- c-glutamyl-transférase + + +,
- accumulation de polyhydroxybutyrate + +,
- production d'oxo-3 lactose -,
- hydrolyse de l'esculine + + +,
- hydrolyse de l'oNPb-galactoside + + +,
- hydrolyse du pNPb-xyloside + + +,
- hydrolyse de l'amidon insoluble -,
- hydrolyse du Tween 80 -,
- lipase sur gélose au jaune d'oeuf -,
- lécithinase -,
- DNase extracellulaire -,
- gélatinase (FRAZIER) -,
- caséinase -,
- culture en milieu minéral M63, en présence de :
 - . glycérol + + +,
 - . mannitol + + +,
 - . inositol + + +,
 - . D-xylose + + +,
 - . L-arabinose + + +,
 - . D-glucose + + +,
 - . saccharose + + +,
 - . raffinose + + +,
 - . mélibiose + + +,
 - . salicine -,
 - . lactose + + +,
 - . acétamide -,
 - . ac. acétique + + +,
 - . ac. hydroxy-3-butyrique + + +,
 - . ac. adipique -,
 - . ac. citrique + + +,
 - . ac. DL-amino-2-butyrique -,
 - . ac. L-aspartique +,
 - . L-arginine + + +,
 - . L-tryptophane -,
 - . ac. hydroxy-3-benzoïque +,
 - . ac. hydroxy-4-benzoïque + + +,
 - . ac. amino-4-benzoïque -,
 - . lysine -,
- réaction à 30°, atmosphère ambiante.

Explication des symboles

- : réaction ou culture négative,
- + : positive,
- + + + : particulièrement intense,
- Ac : acide.

Eléments chimiotaxonomiques

Composition en lipides polaires

Analyse comparative par chromatographie sur couche mince de silice.

Procédé d'extraction : chloroforme/méthanol 1:2

Chromatographie monodimensionnelle :

- solvant de migration : chloroforme/méthanol/eau/

acide acétique : 65:25:4:0.8

- révélation des phospholipides :

. molybdate d'ammonium,

- des lipides aminés :

. ninhydrine,

- des glycolipides :

- . alpha-naphtol,
- des lipides totaux :
- . vanilline/H₂SO₄.

5 Souch de référence :

- Agrobacterium tumefaciens CIP 67.1 (mfl 145)
- absence de lipides glycosylés décelables.

Electrophorèse comparative d'un extrait protéique

10 Conditions de l'analyse électrophorétique

Préparation de l'échantillon

Extraction des protéines solubles par chauffage 10 minutes à 100°C en présence de sodium dodécyl-sulfate à 2 %, à partir de 100 mg environ de pâte bactérienne.

15

Electrophorèse

- matériel :

20

cuve verticale BIORAD PROTEAN II:

- alimentation courant continu modèle BIORAD 500/200

- gel :

gel discontinu de polyacrylamide de 1,5 mm d'épais-

25

seur et 16 cm de longueur,

1er gel : 4 % pH 6,8

2me gel : 7 % pH 8,8

- courant :

35 mA à débit constant pendant cinq heures

30

- température de la cuve :

10°C

- coloration du gel :

bleu de Coomassie R-250.

35

Souches de références :

- Agrobacterium tumefaciens CIP 67.1

- Agrobacterium SP groupe VD CIP 82.11

La souche EO III-50-P est très proche d'Agrobacterium tumefaciens (souche type : CIP 67-1) ; mais elle s'en différencie essentiellement par les profils protéiques comparatifs.

40

Lorsque l'on cultive la souche EO-III-50-P dans des milieux de culture classiques, le système enzymatique objet de la présente invention, se forme essentiellement dans les cellules du micro-organisme.

45

Ces milieux de culture doivent contenir essentiellement des sources de carbone et d'azote assimilables ainsi que d'autres éléments nutritifs nécessaires au développement de la souche EO-III-50-P, tels que des sels minéraux. La production du système enzymatique n'est pas sensiblement améliorée si on ajoute au milieu de culture, comme source d'azote, une hydantoïne substituée en position 5 telle que la PHPH.

50

Par contre, il est avantageux d'introduire, dans le milieu de culture, un inducteur d'activité hydantoïnase non métabolisable. De tels inducteurs sont notamment : l'uracile, le thio-2-uracile, l'aza-6-uracile, la thymine, l'imidazolidinethione, la sec-butylthiohydantoïne, l'orotate de sodium. Ces inducteurs sont avantageusement utilisés à une dose comprise entre 1 mM et 10 mM.

60

Comme source de carbone assimilable, on peut utiliser des hydrates de carbone tels que le glucose,

65

le saccharose, le glycérol, le lactose ou le maltose sous forme pure ou apportés sous forme de résidus complexes tels que les mélasses, le lactosérum ; on peut également utiliser des alcools ou des acides organiques.

Les sources convenables d'azote assimilables sont extrêmement variées. Elles peuvent être des substances chimiques très simples comme l'urée ou des sels minéraux ou organiques d'ammonium. Elles peuvent être aussi apportées par des substances complexes contenant principalement l'azote sous forme protidique, telles que peptones, extraits de levure ou extraits de viande.

Certains éléments minéraux peuvent apporter l'équilibre ionique nécessaire au développement de la souche EO III-50-P, comme les chlorures ou sulfates de métaux alcalins ou alcalino-terreux ou les sels de zinc, de cobalt, de fer, de cuivre, de manganèse, de magnésium. Le pH initial du milieu de fermentation de la culture doit être compris entre 4 et 9, de préférence entre 6 et 8, et avantageusement entre 7 et 7,1.

La température optimale pour la fermentation est de 35°C mais une production satisfaisante est encore obtenue pour des températures comprises entre 20 et 45°C.

L'aération de la fermentation peut varier entre des valeurs assez larges. On a cependant trouvé que des aérations de 0,75 à 2,5 litres d'air par litre de bouillon et par minute conviennent particulièrement bien. Le rendement maximal est obtenu après 8 à 48 heures de culture, ce temps dépendant essentiellement du milieu utilisé.

La présente invention a également pour objet l'application du système enzymatique précédemment décrit à la transformation par voie enzymatique de la PHPH en PHPG.

Selon cette application, la PHPG est préparée en mettant en contact la PHPH avec le système enzymatique de l'invention qui est capable de transformer directement les deux épimères de cette hydantoïne en PHPG sans qu'il soit nécessaire d'opérer à un pH alcalin afin d'effectuer une racémisation chimique.

Le système enzymatique étant produit de manière intracellulaire, son utilisation pour la transformation de la PHPH en PHPG est réalisée selon les méthodes connues de l'homme du métier telles que l'emploi soit d'une suspension de cellules en survie, soit d'un extrait cellulaire obtenu après désintégration des cellules par sonication ou par utilisation d'un "French press", soit par des cellules lyophilisées ou déshydratées à l'aide d'un solvant organique tel que l'acétone, le toluène, soit par des cellules immobilisées selon les techniques classiques.

Le système enzymatique peut être également utilisé sous une forme purifiée ou partiellement purifiée selon les techniques habituelles du génie enzymatique.

La transformation de la PHPH en PHPG par le système enzymatique décrit précédemment est réalisée sous des conditions anaérobies, à un pH compris entre 6 et 8, de préférence à un pH voisin de 6,8 (qui peut être réglé à cette valeur au cours de la transformation par addition d'un agent neutralisant

adéquat), à une température comprise entre 20 et 65°C, de préférence à une température voisine de 50°C, généralement sous une agitation modérée et en suspension dans un milieu aqueux constitué habituellement soit par une solution aqueuse isotonique de chlorure de sodium 0,1M, soit par un tampon phosphate pH = 6,7, 0,1M.

La concentration en hydantoïne dans le milieu réactionnel est généralement voisine de 20 g/litre mais elle peut être inférieure ou supérieure.

Généralement, la durée de réaction est comprise entre 2 heures et 4 jours, mais en fait, elle est poursuivie jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de PHPH de départ.

Le milieu réactionnel peut également contenir des additifs, classiques pour ce type de réaction, tels que des agents tensioactifs, anti-oxydants, anti-mousses, qui peuvent favoriser la formation de la PHPG et permettre ainsi une amélioration du rendement.

Non seulement le système enzymatique décrit précédemment hydrolyse la D-parahydroxyphényl-5 hydantoïne en D-parahydroxyphénylglycine, mais également racémise in situ la L-parahydroxyphényl-5 hydantoïne au fur et à mesure de l'hydrolyse de son épimère. De ce fait, l'application du système enzymatique de la présente invention permet une transformation complète de la D,L-parahydroxyphényl-5 hydantoïne en PHPG optiquement pure.

Selon une variante, la transformation de la PHPH en PHPG par le système enzymatique produit par la souche EO III-50-P est effectuée en présence de co-solvants miscibles à l'eau tels que le diméthylsulfoxyde, le méthoxy-2-éthanol, le diméthylformamide. Ces co-solvants sont utilisés à une concentration inférieure à 5 % en poids par rapport au poids total du milieu réactionnel.

La PHPG obtenue selon l'application de la présente invention peut être isolée du milieu réactionnel selon les méthodes habituelles de séparation des amino-acides, généralement après clarification du milieu réactionnel par centrifugation et filtration sur une résine échangeuse d'ions. Généralement, on effectue une précipitation de l'acide à son point isoelectrique.

Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, montrent comment l'invention peut être mise en pratique.

Exemple 1

1-1 Préparation du système enzymatique

On prépare un milieu de culture aqueux, désigné par la suite A, ayant la composition suivante :

- glycérol : 10 g/l
- extrait de levure : 5 g/l
- extrait de viande : 5 g/l
- peptone pancréatique digérée : 5 g/l
- phosphate monopotassique : 1 g/l
- sulfate de manganèse : 0,02 g/l
- sulfate de magnésium : 0,1 g/l
- sulfate ferreux : 0,02 g/l
- sulfate cuivrique : 0,02 g/l

- sulfate de calcium : 0,02 g/l
- chlorure de sodium : 0,5 g/l
- uracile : 0,5 g/l

Par ailleurs, on prépare une préculture, B, en ensemençant 0,5 litre du milieu A, préalablement stérilisé pendant 20 minutes à 121°C, avec une anse de la souche EO III-50-P (conservée sur le même milieu en présence de 1,4 % d'agar-agar) puis en laissant se développer cette souche pendant 14 heures à 35°C sous une agitation de 200 tours par minute. On obtient ainsi un milieu présentant une densité optique à 610 nm, de 2,4.

Cette préculture B est ensuite introduite dans un fermenteur contenant cinq litres du milieu A stérilisés in situ pendant 20 minutes à 121°C, puis elle est développée, pendant 9 heures, à 35°C, à un pH réglé entre 7,0 et 7,1, sous une agitation de 450 tours par minute et un taux d'oxygène dissous maintenu à une valeur au moins égale à 30 % de la saturation en air. On obtient ainsi un milieu présentant une densité optique, à 610 nm, d'environ 12,5.

La culture terminée, les cellules sont récupérées puis centrifugées pendant 20 minutes, à 4°C, sous 9000 tours par minute, ensuite lavées avec un tampon phosphate pH = 7,00, 0,1M et enfin centrifugées de nouveau. La boue bactérienne ainsi obtenue, désignée C, est mise en suspension dans 1,5 litre d'une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,1M.

1-2 Préparation de la D-parahydroxyphénylglycine

Dans un réacteur équipé d'une agitation et thermostaté à 45°C, on place, sous atmosphère d'azote, la suspension de boue bactérienne précédente, puis on introduit 15 g de parahydroxyphényl-5 hydantoïne racémique. Après 12 heures d'incubation sous agitation modérée, en atmosphère d'azote, à 45°C et à pH réglé à $6,75 \pm 0,1$ par addition d'acide sulfurique 0,1N, on constate la disparition de l'hydantoïne de départ et la présence à une concentration de 8,25 g/l de D-parahydroxyphénylglycine. Le milieu réactionnel est ensuite centrifugé puis on isole la D-parahydroxyphénylglycine du filtrat par précipitation à son point isolélectrique. On obtient ainsi de la D-parahydroxyphénylglycine cristallisée pure présentant une excellente pureté optique, $[\alpha]_D^{25} = -161,2^\circ$, 1 %, HCl N, (littérature $[\alpha]_D^{25} = 157,8^\circ$ 1 % HCl N).

Exemple 2

Dans un réacteur équipé d'une agitation et thermostaté à 45°C, on place sous atmosphère d'azote :

- la boue bactérienne C obtenue selon l'exemple 1,
- 1,5 litre de tampon phosphate pH = 6-7, 0,1M,
- 30 g de parahydroxyphényl-5 hydantoïne racémique.

Après 24 heures d'incubation, sous agitation modérée, en atmosphère d'azote, à 45°C, et à pH réglé à $6,75 \pm 0,1$ par addition d'acide sulfurique 0,1N, on constate la disparition de l'hydantoïne de départ et la présence à une concentration de 16,9 g/litre de D-parahydroxyphénylglycine. Après isole-

ment, on constate par mesure de son pouvoir rotatoire que la D-parahydroxyphénylglycine obtenue est optiquement pure.

5 Exemple 3

3-1- Préparation du système enzymatique

On prépare un milieu de culture aqueux ayant la composition suivante :

- glycérol : 10 g/l
- extrait de levure : 5 g/l
- peptone pancréatique digérée : 5 g/l
- phosphate monopotassique : 1 g/l
- sulfate de magnésium : 0,5 g/l
- sulfate ferreux : 0,02 g/l
- sulfate de manganèse : 0,02 g/l
- thio-2-uracile : 0,13 g/l

Dans un fermenteur de 7 litres, on stérilise 20 minutes à 121°C, 5 litres du milieu de culture précédent puis on l'ensemence comme dans l'exemple 1 avec une culture préparée dans ce milieu de culture selon la méthode donnée à l'exemple 1. La culture est ensuite développée sous des conditions opératoires identiques à celles utilisées à l'exemple 1.

Après 9 heures de fermentation, on obtient un milieu réactionnel présentant une densité optique, à 610 nm, d'environ 14,0. Les cellules sont ensuite isolées comme dans l'exemple 1 et la boue bactérienne obtenue est mise en suspension dans 2 litres d'une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,1M contenant pondéralement 3 % de méthoxy-2-éthanol.

3-2 Préparation de la D-parahydroxyphénylglycine

Dans un réacteur équipé d'une agitation et thermostaté à 45°C, on place, sous atmosphère d'azote, la suspension de boue bactérienne précédente, puis on introduit 5 g de parahydroxyphényl-5 hydantoïne racémique.

Après 390 minutes d'incubation sous agitation modérée, en atmosphère d'azote, à 45°C, et à pH réglé à $6,75 \pm 0,1$ par addition d'acide sulfurique 0,1N, on constate la disparition complète de l'hydantoïne de départ et la présence à une concentration de 4,15 g/l de D-parahydroxyphénylglycine dont la pureté optique est confirmée par une chromatographie en couche mince sur plaque chirale.

Exemple 4

On prépare un milieu de culture aqueux ayant la composition suivante :

- eau de détrempage de maïs : 15 g/l
- saccharose : 10 g/l
- chlorure de sodium : 5 g/l
- phosphate monopotassique : 1 g/l

150 ml de ce milieu de culture, ajustés à pH = 7,1 et stérilisés pendant 20 minutes à 121°C, sont nsemencés avec une anse de la souche EO III-50-P prélevée sur une culture sur milieu solide. Après 24 heures d'incubation, à 35°C, en milieu agité, les

cellules sont isolées par centrifugation puis mises en suspension dans 50 ml de tampon phosphate, pH = 6,70, 0,1M. Dans cette suspension agitée, sous atmosphère d'azote, on introduit 250 mg de parahydroxyphényl-5 hydantoïne racémique, puis on laisse se développer la culture à 50°C, en atmosphère d'azote. Après 20 heures de réaction, une analyse d'une prise d'essai montre la disparition complète de l'hydantoïne de départ et la présence à une concentration de 4,15 g/l de D-parahydroxyphénylglycine dont la pureté optique est confirmée par chromatographie sur couche mince sur plaque chirale.

Exemple 5

On prépare un milieu aqueux de culture ayant la composition suivante :

- eaux de détrempage de maïs : 15 g/l
- lactose : 10 g/l
- chlorure de sodium : 5 g/l
- phosphate monopotassique : 1 g/l

150 ml de ce milieu, ajustés à pH = 7,1 et stérilisés pendant 20 minutes à 21°C, sontensemencés avec une anse de la souche EO III-50-P prélevée sur une culture sur milieu solide. Après 24 heures d'incubation à 35°C, en milieu agité, les cellules sont isolées par centrifugation puis reprises comme dans l'exemple 4 par 50 ml de tampon phosphate pH = 6,70, 0,1M. Cette suspension est ensuite désintégrée dans un "French press".

Dans la bouillie cellulaire ainsi obtenue, on introduit ensuite 250 mg de parahydroxyphényl-5 hydantoïne racémique puis on incube cette suspension à 50°C, sous atmosphère d'azote. Après 15 heures d'incubation, l'analyse d'une prise d'essai indique la présence de D-parahydroxyphénylglycine, optiquement pure, à une concentration de 4,05 g/l.

Il va de soi que la présente invention n'a été décrite qu'à titre purement explicatif et nullement limitatif et que toute modification, notamment au niveau des équivalences techniques, pourra y être apportée sans sortir de son cadre.

Revendications

Système enzymatique susceptible d'être obtenu par culture d'un micro-organisme, caractérisé par le fait que ce micro-organisme est un Agrobacterium très proche de l'espèce tumefaciens identifié par une souche déposée à la Collection Nationale des Micro-organismes à l'Institut Pasteur de Paris sous le N° I-671.

2. Système enzymatique selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est obtenu par une culture du micro-organisme défini à la revendication 1 effectuée en présence d'un inducteur d'activité hydantoïnase non métabolisable choisi dans le groupe constitué par l'uracile, le thio-2-uracile, l'aza-6-uracile, la thymine, l'imidazolidinethione, la sec-butylthiohydantoïne, l'orotate de sodium.

3. Application du système enzymatique selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 à la transformation de la D,L-parahydroxyphényl-5 hydantoïne en D-parahydroxyphénylglycine.

4. Application selon la revendication 3, caractérisée par le fait qu'elle est réalisée en présence d'un solvant organique non miscible à l'eau.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 88 40 2259

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y	FR-A-2 431 536 (SNAMPROGETTI S.P.A.) * En entier * ---	1,3	C 12 P 13/04 C 12 N 9/86 // C 12 N 9/90
Y	BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 13, no. 10, octobre 1981, pages 2173-2183, John Wiley & Sons, Inc., New York, US; R. OLIVIERI et al.: "Microbial transformation of racemic hydantoins to D-amino acids" * En entier * ---	1,3	
A	GB-A-2 042 531 (KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO K.K.) ---		
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 90, no. 17, avril 1979, page 379, résumé no. 136254b, Columbus, Ohio, US; & JP-A-78 136 583 (KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRY CO. LTD) 29-11-1978 ---	1,3	
A	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 51, no. 2, février 1987, pages 355-362, Tokyo, JP; K. YOKOZEKI et al.: "Screening of microorganisms producing D-p-hydroxyphenylglycine from DL-5-(p-hydroxyphenyl)hydantoin" -----		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) C 12 N C 12 P
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 20-12-1988	Examineur DESCAMPS J.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant			

EPO FORM 1503 03.82 (P0407)

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000

100-100000